

## **Отзыв официального оппонента**

**доктора медицинских наук, профессора, Боженко Владимира Константиновича на диссертационную работу Рудаковой Анны Андреевны «Эффективность синтетических неоантигенных пептидов в модели персонализированной противоопухолевой вакцины», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.**

### **Актуальность темы исследования**

Одной из основных причин возникновения злокачественных опухолей принято считать возникновение соматических мутаций. Мутантные белки, а также нарушенная экспрессия немутировавших генов отличают злокачественные клетки от других клеток организма. Эти специфичные для опухоли антигены, возникшие в результате накопления соматических мутаций в злокачественных новообразованиях, называются неоантигенами. Именно эпитопы неоантигенов являются мишенями для иммунной системы, и иммунный ответ на их появление предотвращает возникновение злокачественных новообразований. А если новообразование все же возникло и развивается, остается возможность индуцировать иммунные реакции против злокачественных клеток и таким образом остановить или замедлить прогрессию онкологического заболевания, а в некоторых случаях можно даже добиться полного выздоровления пациента.

Одно из активно развивающихся направлений иммунотерапии – противоопухолевые терапевтические вакцины, они направлены на индукцию или усиление в организме адаптивных иммунных реакций, специфических к неоантигенам опухоли. Достижения последнего десятилетия в NGS-секвенировании и компьютерном анализе полученных данных привели к быстрой и доступной идентификации индивидуальных неоантигенов у пациентов и значительно расширили спектр потенциальных мишеней для

персонализированной иммунотерапии. Несмотря на имеющиеся достижения в технологии разработки и получения противоопухолевых вакцин, в настоящее время в клинической практике они практически не применяются или имеют недостаточную эффективность.

Таким образом актуальность исследования Рудаковой Анны Андреевны, посвященного оценке иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для разработки технологии противоопухолевых вакцин не вызывает сомнений.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна**

Объектом исследования диссертационной работы Рудаковой А.А. стали синтетические неоантигенные пептиды, последовательности которых были получены в результате секвенирования ДНК мышины меланомы В16-F10, соответствующие уникальным соматическим мутациям опухоли и отобранные с помощью биоинформационного анализа по способности высокоаффинно связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Работа основывается на изучении иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины против мышины меланомы В16-F10, содержащих комбинации смесей синтетических неоантигенных пептидов.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %). Иммуногенность пептидов оценивали по количеству клеток, продуцирующих интерферон- $\gamma$ . Статистические расчеты проводились с помощью программы «Statistica v.7», программы Microsoft® Excel®.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, изложена на 114 листах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав: 1) обзор литературы, 2) материалы и методы, 3) результаты и 4) обсуждения полученных результатов, выводов, списка сокращений и списка литературы.

Список литературы включает 200 источников: 5 отечественных и 195 зарубежных. Работа изложена на 114 страницах, текст иллюстрирован 19 рисунками и 11 таблицами.

**Во введении** автор обосновывает актуальность проблемы, которой посвящено исследование, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость проведенного исследования, методы и методологию исследования, формулирует предложения, выносимые на защиту, обосновывает достоверность, демонстрирует перечень значимых научных конференций, на которых была проведена апробация результатов исследования.

Глава **«Обзор литературы»**, состоит из 5 разделов и содержит сведения о современных подходах к разработке вакцинотерапии опухолей, подробно описано значение неоантигенов опухоли в качестве мишеней для разработки иммунотерапии, и проведен анализ информации о пептидных неоантигенных противоопухолевых вакцинах. Также представлены данные об адъювантах для противоопухолевых вакцин – агонистов TLR-3.

Глава **«Материалы и методы»** содержит перечень исследуемых в работе пептидов и способы приготовления моделей вакцин, а также схемы вакцинации животных. Также в данной главе описаны методики получения сыворотки крови мышей и подготовки клеток селезенки для исследований, культивирования клеток меланомы *in vitro* и перевивки их мышам *in vivo* для дальнейшего изучения противоопухолевого эффекта. Приведены методы оценки иммуногенности: ELISpot, ELISA и метод оценки изменений иммунофенотипа селезенки мышей с использованием проточной цитометрии. Статистическую обработку данных ELISpot проводили с использованием программ Excel и GraphPad Prism 5.0, результаты сравнивали с помощью непарного t-теста. Для статистического анализа данных проточной цитометрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7.

В главе «Результаты» автор представляет результаты оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины, содержащих как монопептиды, так и различные их комбинации при двукратном или четырех кратном подкожном введении. Глава состоит из 5 параграфов и включает исследование иммуногенности и противоопухолевой активности 43 пептидов как в чистом виде, так и в различных комбинациях. Автор также оценивает влияние адьюванта Poly(I:C), представляющего собой синтетический аналог двуцепочечной РНК, агонист TLR-3 на иммуногенность разрабатываемых вакцин. В работе использовано 404 инбредных мышей, из них самок 234 и 170 самцов линии C57Bl. В качестве показателей иммуногенности исследовались уровни цитокинов INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4 и IL-10 в сыворотке крови, индукция продукции интерферона гамма спленоцитами в ответ на стимуляцию антигенами. Для оценки противоопухолевого эффекта вакцин использовалась модель подкожной трансплантации опухоли и стандартные критерии оценки торможения ее роста. Проведенные автором исследования убедительно доказали, что использование пептидных вакцин, в комбинации с адьювантом приводит к инициации специфического иммунного ответа, выявляемого по появлению иммунных клеток в селезенке и повышению уровней цитокинов в периферической крови. Анализ торможения роста опухоли на фоне проводимой иммунизации позволил выявить наиболее эффективные пептидные эпитопы, применение которых в виде вакцин позволяет вызвать полное торможение роста и увеличение продолжительности жизни до 100% с полным излечением 40% животных. Эти результаты позволяют заключить, что автору удалось разработать алгоритм поиска антигенных эпитопов и создать эффективную вакцину для терапии конкретной злокачественной опухоли. Полученный подход является перспективным для его трансляции в клиническую онкологию.

В качестве пожелания хотелось бы иметь данные по длительности формируемого противоопухолевого иммунитета и оценки возможности

использования разработанного подхода для получения профилактических противоопухолевых вакцин.

В главе «Обсуждение полученных результатов» автор проводит сравнение полученных результатов с имеющимися литературными данными, обсуждает преимущества и недостатки использованной методологии.

В «Заключении» автор описывает ключевые моменты диссертационной работы и подводит итоги своему научному исследованию. Заключение логично построено в соответствии с результатами исследований.

Сформулированные выводы полностью соответствуют полученным результатам работы, а автореферат отражает содержание диссертации

### **Заключение.**

Диссертационная работа Рудаковой Анны Андреевны «Эффективность синтетических неоантигенных пептидов в модели персонализированной противоопухолевой вакцины» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне с использованием современных методов исследования, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной задачи персонализированной вакцинотерапии с использованием неоантигенов в качестве мишеней для лечения злокачественных новообразований.

По своей актуальности, уровню и объему проведенных исследований, научной новизне полученных результатов и их практической значимости, способу решения поставленных задач диссертационная работа Рудаковой А.А. полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября 2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата

наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Руководитель отдела молекулярной диагностики  
и экспериментальной терапии опухолей  
ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач России (14.00.14 –  
онкология (медицина))



Боженко Владимир Константинович

« 10 » 03 20 23 г.

Даю свое согласие на обработку персональных данных.

Подпись д.м.н., профессора Боженко В.К. заверяю.  
Ученый секретарь  
ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
доктор медицинских наук, профессор



Цаллагова Земфира Сергеевна

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86  
<https://www.rncrr.ru/>  
E-mail: mailbox@rncrr.ru